

ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

*На правах рукописи*

САБИРОВА АЛЬБИНА РУШАНОВНА

**СТРУКТУРА ГЕНА НОВОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ  
*BACILLUS INTERMEDIUS* И РЕГУЛЯЦИЯ ЕГО ЭКСПРЕССИИ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2011

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор  
Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук  
Коксин Владимир Петрович

Кандидат биологических наук  
Давыдова Марина Николаевна

Ведущая организация: Казанский научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии

Защита диссертации состоится «24» февраля 2011 г. в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, ауд. 211.  
Факс 8(843)238-71-21, 233-78-40. E-mail: [albina-12@mail.ru](mailto:albina-12@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского федерального университета

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» января 2011 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

З. И. Абрамова

**Актуальность.** Протеолитические белки вовлечены во все основные физиологические процессы, включая регуляторный протеолиз, и являются стратегическими ферментами клеток микроорганизмов. По результатам секвенирования геном *Bacillus subtilis* содержит 62 гена протеолитических белков, среди которых 9 кодируют секретлируемые протеазы, 13 - мембраносвязанные протеазы и 6 генов кодируют протеазы, локализованные в клеточной стенке [Rey et al., 2004]. Многие из белков, соответствующих этим генам, пока не выделены, их физиологические функции не установлены. В международных базах данных содержится обширная информация о фрагментах последовательностей геномных ДНК различных видов бацилл, в том числе *B.subtilis*, *B.cereus*, *B.licheniformis* и других, что позволяет проводить геноинформационный анализ по идентификации генов и сравнению фрагментов геномов. Особый научно-практический интерес представляют ранее не идентифицированные белки протеолитического спектра, что обусловлено необходимостью расширения общих представлений об эволюционном развитии этой группы гидролаз, и выявления новых, практически значимых, ферментов с полезными свойствами.

Бациллы в ходе эволюции выработали сложную и разветвленную регуляторную систему, в основе которой лежит механизм сигнальной трансдукции, а именно, сеть двухкомпонентных систем регуляции экспрессии генов [Aguilar et al, 2001]. Выяснение регуляторных сетей, управляющих экспрессией поздних генов, к которым относятся гены протеолитических белков, открывает новые перспективы в микробной биотехнологии. Молекулярные механизмы, контролирующие интегрированный ответ микробной клетки на изменения среды, в настоящее время изучены недостаточно. Вклад разных систем регуляции в клеточный ответ можно оценить с помощью мутантных штаммов с дефектными регуляторными белками. Способы регуляции экспрессии поздних генов отражены в структуре промоторов, анализ которых позволяет определить потенциальные механизмы активации транскрипции.

**Целью** работы явился поиск, изоляция и характеристика гена новой металлоэндопептидазы (*mprBi*) из фрагмента хромосомной ДНК *B.intermedius* и изучение его экспрессии.

Основные **задачи** исследования:

1. Установить последовательность нуклеотидов 6 кб фрагмента хромосомной ДНК *B.intermedius*, провести поиск, идентификацию и характеристику открытых рамок считывания генов, включая гены протеолитических белков.

2. Клонировать ген внеклеточной металлопротеиназы *B.intermedius* и провести анализ его структурной организации.

3. Изучить экспрессию гена *mprBi* в штамме, мутантном по регуляторным белкам DegS-DegU системы сигнальной трансдукции, контролирующей синтез ферментов деградации.

4. Исследовать влияние фактора транскрипции TnrA, одного из регуляторов азотного обмена у бацилл, на экспрессию гена металлопротеиназы *B.intermedius*.

5. Изучить экспрессию гена *mprBi* в штаммах бацилл, дефектных по Spo белкам, участвующих в споруляции у бацилл.

**Научная новизна.** Основной научный приоритет работы заключается в идентификации у бацилл нового гена секретируемой металлоэндопептидазы – первого бактериального гомолога эукариотических адамализинов. Установлена последовательность нуклеотидов 6 кб фрагмента хромосомной ДНК *B.intermedius*, в которой выявлены шесть открытых рамок считывания (AN EU678894). Впервые у микроорганизмов изолирован ген *mprBi*, кодирующий внеклеточную металлопротеиназу *B.intermedius* семейства M12 адамализинов/репролизинов клана метцинкинов. Получены приоритетные данные о зависимости экспрессии гена адамализин-подобной металлопротеиназы от DegS-DegU регуляторной системы, контролирующей синтез ферментов биodeградации, TnrA фактора транскрипции, участвующего в азотном обмене, механизма катаболитной репрессии, а также об отсутствии корреляции экспрессии гена *mprBi* с процессом спорообразования.

**Практическая значимость результатов.** Секвенированный фрагмент хромосомной ДНК, содержащий ген металлопротеиназы *B.intermedius*, занесен в базу данных Международного ГенБанка (AN EU678894) и может быть использован для сравнительного анализа генов и геномов. Результаты секвенирования полного гена *mprBi* позволили оценить последовательность продукта трансляции, включая сигнальный пептид и пропептидную область белка, а также провести его корректную классификацию. Получен вектор экспрессии pSA1, несущий 1,2 кб вставку с геном *mprBi* для выделения соответствующего белка и изучения его свойств. Данные о структуре промотора и контроле экспрессии гена *mprBi* могут быть использованы при конструировании систем экспрессии на основе модификации промотора для практического применения.

**Связь работы с научными программами.** Работа выполнялась в соответствии с планом НИР Казанского федерального университета (№ гос. регистрации 01:02.00 104982 «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»). Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ №05-04-48182 и №09-04-99044, Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры

инновационной России» 2009-2013 гг: ГК № ПЗ44, ГК № П406, ГК № ПЗ23, грантом Академии наук Республики Татарстан №14-24/2010 (Г).

***Положения, выносимые на защиту:***

1. Изолированный и охарактеризованный ген *B.intermedius* кодирует новую металлоэндопептидазу бацилл, которая относится к семейству адамализинов/репролизинов клана метцинкинов и является первым прокариотическим гомологом эукариотических адамализинов.

2. Экспрессия гена *mprBi* контролируется системой DegS-DegU, которая отвечает за синтез ферментов деградации, фактором транскрипции TnrA, регулирующим азотный обмен при дефиците этого источника питания, и не зависит от Sro-регуляторных белков, участвующих в контроле споруляции.

***Апробация работы.*** Основные положения диссертации были представлены на международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» (Казань, 2005 г.), Международных конференциях для студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2007, 2008 гг.), Международном симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Москва, 2007 г.), Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2008 г.), Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009 г.), Российской школе молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010 г.), Всероссийской молодежной научной конференции «Современные биологические аспекты в фундаментальных исследованиях молодых ученых» (Томск, 2010 г.) и Итоговых научных конференциях студентов КФУ (Казань, 2005, 2007 гг.), Итоговых научных конференциях сотрудников КФУ (Казань, 2008, 2009, 2010 гг.).

***Публикации.*** По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, из них 6 статей в центральных отечественных и зарубежных рецензируемых журналах.

***Структура и объем диссертации:*** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, включает 7 таблиц, 38 рисунков. Библиография содержит 208 наименований, в т.ч. 202 - зарубежных авторов.

***Благодарности.*** Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю профессору М. Р. Шариповой за постановку проблемы, внимательное отношение к работе и плодотворное обсуждение полученных результатов; к.б.н., с.н.с. Н. П. Балабан и к.б.н., доц. А. М.

Мардановой за постоянное внимание, помощь в работе и консультации. Отдельная благодарность выражается профессору С. В. Кострову (ИМГ РАН, Москва), к.б.н., в.н.с. И. В. Демидюку (ИМГ РАН, Москва), профессору Е. Феррари (Международная инкорпорация Генкор, США), профессору Д. Зайглеру (*Bacillus* Stock Center, Университет Охайо, США), профессору Е. Сахилду (Университет Копенгагена, Дания), профессору Й.Штульке (университет Геттингена, Германия), профессору Я. Маартену Ван Дижлу (университет Гронингена, Голландия) за предоставление для работы лабораторных штаммов и плазмид. Автор искренне благодарен заведующей кафедрой микробиологии КФУ профессору О. Н. Ильинской и сотрудникам кафедры за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### **Штаммы бактерий, векторы, плазмиды и среды культивирования.**

Объектом исследования являлся рекомбинантный эритромициноустойчивый штамм *Bacillus subtilis*. Он получен путем трансформации плазмиды pSA1 в протеазо-дефицитный штамм *B. subtilis* BG2036, из хромосомы которого deletированы гены внеклеточных протеиназ (штамм предоставлен проф. Eugenio Ferrarri, Genencor Int. Inc., USA). Мультикопийная плазида pSA1 сконструирована на основе вектора экспрессии pCB22 [Sorokin et al., 1990] и несет полный ген металлопротеиназы *B.intermedius* (*mprBi*) под собственным промотором. Ген субклонирован после секвенирования 6 кб фрагмента геномной ДНК *B. intermedius* с плазмиды pCM4 (плазида pCM4 предоставлена проф. С. В. Костровым, ИМГ РАН, г. Москва). Штаммы *B.subtilis* 8G5  $\Delta degS \Delta degU$  (like 8G5; *degS*, *degU*; Km<sup>r</sup>), с мутацией по генам *degS* и *degU*, *B.subtilis* 8G5 *degU32*(Hy) (like 8G5; *degU32*(Hy); Km<sup>r</sup>) с мутацией по гену *degU*, ведущей к Hy-фенотипу и *B.subtilis* 8G5 (*trpC2*; *tyr*; *his*; *nic*; *ura*; *rib*; *met*; *ade*; *sipP*) с полноценными регуляторными белками предоставлены доктором Я. Маартен Ван Дижлом, университет Гронингена, Голландия. Штамм *B.subtilis*  $\Delta tnrA$ -LCC с мутацией по гену *tnrA* (Em<sup>R</sup>), предоставлен профессором Е. Сахилдом, Университет Копенгагена, Дания. Штаммы *B.subtilis* GP254 (*trpC2*;  $\Delta amtB$ , Cm<sup>r</sup>), *B.subtilis* GP253 (*trpC2*;  $\Delta glnK$ , Cm<sup>r</sup>) предоставлены проф. Й. Штульке, университет Геттингена, Германия. Штаммы, дефектные по spo-зависимым генам, и *B.subtilis* 168 (*trpC2*) предоставлены профессором Д. Зейглером из *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC), Университет Охайо, США.

Культивирование бактерий проводили на следующих средах: среда LB (%): триптон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; NaCl – 0,5; pH 8.5 [Sambrook et al., 1989]. Агаризованная среда LA включала дополнительно 2% агара. Среда для трансформации штаммов *B.subtilis* включали солевую основу среды Спицайзена, среду Спицайзена I и среду Спицайзена II [Anagnostopoulous & Spizizen, 1961]. Синтетическая минимальная среда SMM включала солевую

основу, микроэлементы [Saxild et al., 1987]. Идентификационная агаризированная среда для отбора клонов, способных секретировать протеиназу, включала 30% обезжиренного молока и 2% агара. Среда стерилизовали при 1 атм. в течение 30 мин., pH довели перед стерилизацией среды 40%-ным раствором NaOH до значения 8,5. Для изучения влияния углеродной катаболитной репрессии в среду SMM вносили 10 mM глюкозы. Для изучения влияния азотной катаболитной репрессии в среду SMM вносили соли NaNO<sub>3</sub> и NH<sub>4</sub>Cl в конечной концентрации 20 mM.

При выращивании рекомбинантных штаммов в среду вносили антибиотики (конечная концентрация в среде): для штаммов *B.subtilis* с плазмидами pCB22, pCM4, pSA1 – эритромицин (20 мкг/мл); для штаммов *B.subtilis*, мутантных по белкам AmtB и ClnK - хлорамфеникол (20 мкг/мл); для штаммов *B.subtilis*, мутантных по белкам DegS и DegU, канамицин (20 мкг/мл).

**Выделение плазмидной ДНК** проводили с помощью набора реактивов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Электрофорез плазмидной ДНК проводили по методу, описанному ранее [Sambrook et al., 1989].

**Рестрикционное картирование ДНК.** Последовательность фрагмента геномной ДНК *B.intermedius* анализировали с помощью программы Vector NTI и определяли потенциальные сайты рестрикции. Амплификат 6 кб фрагмента ДНК *B.intermedius* обрабатывали рестриктазами в разных комбинациях: BglII, DraI, HindII, NdeI, PvuII, SacI, SalI, XbaI. Рестрикцию ДНК проводили набором рестриктаз фирмы “Сибэнзим” в течение 2 ч при 37° С в условиях, рекомендованных производителем.

**Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидной ДНК** проводили, как описано в работе [Anagnostopoulous et al., 1961]. Трансформацию протопластов *B.subtilis* плазмидной ДНК проводили, как описано в работе [Chang et al., 1979].

**Определение протеолитической активности металлопротеиназы** проводили по расщеплению 1% азоказеина по методу, описанному ранее [Demidyuk et al., 2006]. Определение активности на синтетических хромогенных субстратах Z-Ala-Ala-Leu-pNA и Z-Glu-pNA проводили по методике, описанной в работе [Leshchinskaya et al., 1997]. Определение казеинолитической активности определяли по методу Каверзневой [Каверзнева, 1971]. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин. Продуктивность культуры определяли как отношение величины протеолитической активности к оптической плотности культуральной жидкости и выражали в усл. ед.

**Исследование влияния ингибиторов на активность фермента.** В реакционную смесь добавляли ингибитор в конечной концентрации 5 mM и выдерживали пробу в присутствии реагента в течение 1 ч при комнатной

температуре, после чего определяли остаточную активность по гидролизу азоказеина. Остаточную активность выражали в процентах. За 100% (контроль) принимали активность фермента в отсутствие ингибиторов в реакционной смеси. В работе использовали специфический ингибитор сериновых протеиназ PMSF, ингибиторы металлопротеиназ ЭДТА и 1,10-фенантролин, а также белковый ингибитор трипсина.

**ДНК секвенирование.** Фрагмент геномной ДНК *B.intermedius* размером в 5896 п.о. на плазмиде pCM4 амплифицировали с помощью синтетических олигонуклеотидов, комплиментарных фланкирующим областям плазмиды pCB22 (pCB rev – ATAGCTTTATAGAGTAGGTC, pCB dir – CCACTATCGACTACGCG). Условия проведения ПЦР реакции: 94° С 1 мин. – 1 цикл; 94° С 30 сек., 43° С 30 сек., 72° С 6 мин. – 30 циклов; 72° С 10 мин – 1 цикл. Результаты ПЦР реакции оценивали электрофоретически в 1% агарозном геле. В пробирки объемом 0,5 мл вносили стандартное количество праймера – 3,2 pmol. В зависимости от типа матрицы и ее размера концентрация праймеров (нг) варьировала: ПЦР-продукт: > 2000 п.о. – 20-50 нг; плазида: 6000 – 10000 п.о. – 300-400 нг. Образцы упаривали в вакуумной центрифуге или в термостате при температуре 60-65° С, пробирки выдерживали при комнатной температуре 10-15 мин, чтобы избежать образования конденсата.

Определение нуклеотидной последовательности проводили методом терминации цепи с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1, используя в качестве матрицы амплификат вставки с плазмиды pCM4 (Межинститутский Центр коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН, <http://www.genome-centre.narod.ru/>). Последовательность нуклеотидов депонировали в международную базу данных GenBank под номером AN EU 678894.

**Субклонирование ДНК.** Последовательность гена *mprBi* амплифицировали, используя синтетические олигонуклеотиды: mprBiDir (TAACCTGGATCCCAATCAAAGGAGGGATAGG), соответствующий началу регуляторной области гена протеиназы с сайтом для узнавания рестриктазой *Bam*HI (подчеркнуто); и mprBiRev (CATAAAGGATCCCAAGCACATAGGTGTTTG), соответствующий концу кодирующей области гена протеиназы с сайтом для узнавания рестриктазой *Bam*HI (подчеркнуто). Обработанный рестриктазой продукт амплификации очищали, используя набор GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas), и клонировали в плазмиду pCB22, предварительно обработанную *Bgl*II рестриктазой.

**Гено-информационный анализ последовательности** секвенированного фрагмента ДНК *B.intermedius* проводили с использованием алгоритма BLAST: пакета программ, представленных на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [Altschul et al., 1997] и программы Vector



NTI Suite 8.0. Поиск открытых рамок считывания проводили с помощью программы ORF Finder ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf)). Потенциальный сайт отщепления сигнального пептида определяли с использованием алгоритма SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), который позволяет определить функционально-активный сигнальный пептид в последовательности аминокислот [Bendtsen et al., 2004]. Потенциальные –10 и –35 области для узнавания  $\sigma^A$ -фактором транскрипции идентифицировали в промоторе гена металлопротеиназы *B. intermedius* при использовании сервера Softberry BPROM network [Helmann, 1995]. Потенциальные участки связывания с белками-регуляторами DegU, Spo0A, TnrA в регуляторной области гена *mprBi* выявляли с использованием пакета программ Vector NTI Suite 8.0.

Для сравнительного анализа использовали последовательности фрагментов геномов бацилл, имеющиеся в свободном доступе на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): *B. pumilus* SAFR-032 (YP\_001488604.1), *B. pumilus* ATCC 7061 (ZP\_03055196.1), *B. licheniformis* ATCC 14580 (YP\_081058.1).

**Статистическую обработку данных** для анализа экспериментальных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Секвенирование и характеристика 6 кб фрагмента геномной ДНК *B. intermedius*.** В библиотеке геномной ДНК *B. intermedius*, полученной в Институте молекулярной генетики (ИМГ РАН, Москва), идентифицирован клон, протеолитическая активность которого снижалась в присутствии ингибиторов металлопротеиназ. Фрагмент хромосомной ДНК *B. intermedius* клонировали в вектор экспрессии pCB22 с получением плазмиды pCM4, которой трансформировали штамм-реципиент *B. subtilis* 20-36, дефектный по генам собственных секретируемых протеолитических ферментов. Изучение гетерологичной экспрессии гена металлопротеиназы *B. intermedius* в беспротеазном штамме *B. subtilis* показало, что максимальная активность в культуральной жидкости соответствовала 32 ч. роста культуры по гидролизу азоказеина и 36 ч. роста по гидролизу казеина (рис. 1). Активность фермента по расщеплению белковых субстратов практически полностью подавлялась в присутствии специфических ингибиторов металлопротеиназ, тогда как ингибиторы сериновых протеиназ не оказывали влияния на протеолитическую активность рекомбинантного штамма. Активность по расщеплению специфических субстратов для сериновых протеиназ не была обнаружена. Полученные результаты позволили заключить, что фрагмент хромосомной

ДНК *B.intermedius*, клонированный на плазмиде pCM4, содержит ген, кодирующий секретируемый белок, относящийся к классу металлопротеиназ.

Рестрикционный анализ плазмиды pCM4 показал, что размер клонированного фрагмента геномной ДНК составил 6 кб. Проводили определение его нуклеотидной последовательности. После секвенирования протяженность клонированного фрагмента геномной ДНК *B.intermedius* составила 5896 п.н. Рестрикционное картирование показало наличие в последовательности ДНК сайтов узнавания для пяти рестриктаз - *Bgl*II, *Xba*I, *Hpa*I, *Sal*I, *Hind*III. ОПС-анализ секвенированной ДНК в программе BLAST показал присутствие шести открытых рамок считывания (ОРС) генов, кодирующих различные полипептиды (рис. 2).

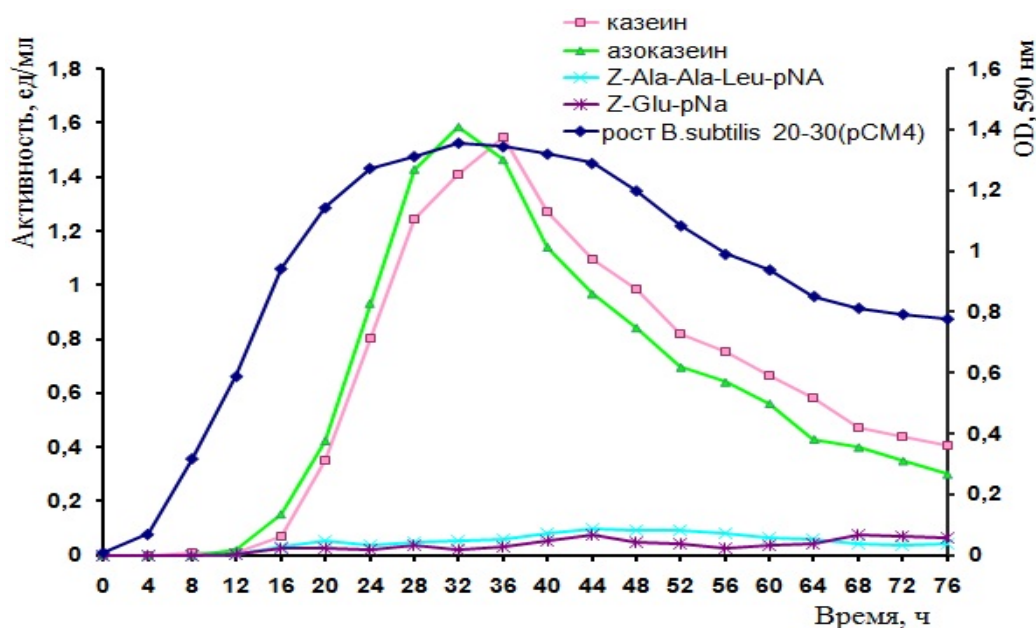


Рис. 1. Динамика роста и накопления протеолитической активности в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B.subtilis* 20-36 (pCM4).

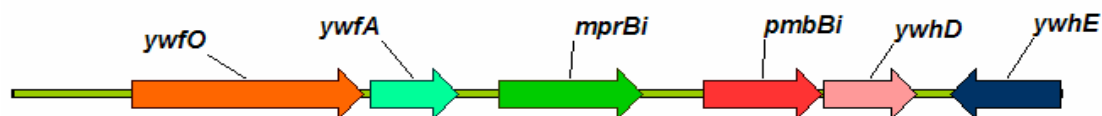


Рис. 2. Схема расположения открытых рамок считывания, идентифицированных во фрагменте геномной ДНК *B.intermedius*.

Рамки считывания обозначены стрелками: *ywfO* – металл-зависимая фосфогидролаза, *ywfA* – гипотетический белок, *mprBi* – секретируемая металлопротеиназа, *pmBbi* – мембраносвязанная металлопротеиназа, *ywhD* – гипотетический белок, *ywhE* – пенициллин-связывающий белок.

В секвенированной ДНК идентифицированы гены двух протеолитических белков – *pmBbi* и *mprBi*. Оба гена кодируют

металлопротеиназы. Их сравнительный анализ показал отсутствие гомологии в структурной части генов. Соответствующие им белки относятся к разным семействам и выполняют в клетке различные функции. Анализ конвертированных аминокислотных последовательностей показал наличие различных структурных доменов в первичной структуре полипептидов. Наличие структурного домена ZnMc в последовательности гена *mprBi* свидетельствует о том, что продукт этого гена принадлежит к клану МА метцинкинов семейства M12 секретируемых цинк-зависимых металлопротеиназ. Поиск гомологии последовательности гена *mprBi* с генами известных протеиназ в базе данных NCBI показал 98% гомологию с геном, кодирующим репролизин семейства цинк-зависимых металлопротеиназ *B.pumilus* ATCC 7061. Отметим, что ген *B.pumilus*, а также его продукт не изолированы и не охарактеризованы, функция установлена на основе сравнительного анализа с генами эукариотических металлопротеиназ клана метцинкинов. Анализ продукта гена *mprBi* проводили с применением программы SignalP, позволяющей идентифицировать в последовательности потенциальный сайт отщепления сигнального пептида. В результате, в структуре MprBi обнаружен потенциальный сайт (ASA) отщепления сигнальной последовательности, что свидетельствует о внеклеточной локализации зрелого белка.

Наличие структурного домена S2P-M50 в последовательности гена *ptbBi* указывает на принадлежность кодируемого белка к клану MM семейства M50 мембраносвязанных металлопротеиназ (MEROPS M50.002). Поиск гомологии последовательности гена *ptbBi* с генами известных протеиназ в базе данных NCBI показал 98% гомологию с геном, кодирующим мембраносвязанную металлопротеиназу семейства M50 *B.pumilus* ATCC 7061, продукт которого также не исследован. Анализ аминокислотной последовательности гена *ptbBi* с помощью программы SignalP показал отсутствие потенциального сайта отщепления сигнального пептида. По результатам анализа PtbBi является интегральным мембранным белком. Отсутствие гомологии гена *ptbBi* с геном *mprBi* свидетельствует о том, что белок PtbBi не является предшественником внеклеточной металлоэндопептидазы MprBi, и эти белки выполняют в клетке различные функции.

Наличие структурного домена S2P-M50 в последовательности гена *ptbBi* явилось основанием для сравнительного анализа с генами других представителей семейства металлопротеиназ M50. Ферменты этого семейства характеризуются присутствием в структуре четырех трансмембранных сегментов (для эукариотических гомологов 6 сегментов) и 3х консервативных мотивов, указанных стрелками на рис. 3.

Сравнительный анализ показал, что локализованный на 6 кб фрагменте ДНК *B.intermedius* ген *ptbBi* кодирует мембраносвязанную

металлопротеиназу семейства регуляторных белков M50. Среди членов семейства M50 охарактеризованный бациллярный белок – фактор споруляции SpoIVFB. Он активен на поздних стадиях споруляции и осуществляет процессинг предшественника спороспецифического фактора транскрипции sigK, который активирует транскрипцию спороспецифических генов в материнской клетке [Akiyama et al., 2004]. Регуляторная протеиназа SpoIVFB содержит характерный мотив HExxH, который локализован на одном из трансмембранных сегментов (Регион А), а также мотив из четырех аминокислотных остатков NPDG (Регион С) (рис. 3). Идентичные домены выявлены в последовательности металлопротеиназы PmbBi. По результатам анализа сделано заключение, что ген *pmbBi* кодирует регуляторный белок клана MM мембраносвязанных металлопротеиназ.

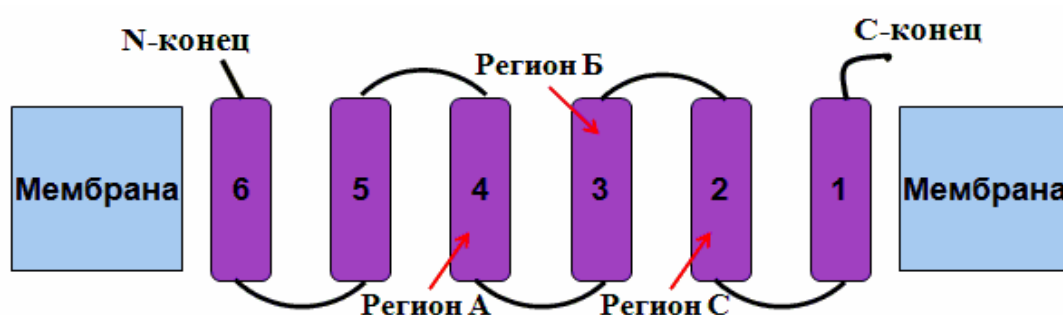


Рис. 3. Схема интрамембранной организации металлопротеиназ семейства M50. Регионы А, Б, С – консервативные домены [Lewis, Thomas, 1999].

Итак, различие в структурной организации генов *mprBi* и *pmbBi*, принадлежность к различным семействам металлопротеиназ свидетельствуют о том, что продукты этих генов представляют ферменты с различной клеточной локализацией и выполняют различные физиологические функции в клетках бацилл.

#### **Изоляция и характеристика гена металлопротеиназы *B.intermedius*.**

На рис. 4 представлена нуклеотидная последовательность гена секретируемой металлопротеиназы *mprBi* и соответствующая аминокислотная последовательность. ОПС гена состоит из 810 п.о., что соответствует 270 а.к.о. Предполагаемый сайт инициации трансляции представлен ATG кодоном в отличие от сериновой протеиназы *B.intermedius*, стартовым кодоном которой является нестандартный кодон GTG. В структуре гена идентифицированы потенциальный сайт Шайна-Дальгарно (SD) и регуляторные области - 10 (GAATATA) и - 35 (TAGAAG). С помощью программы SignalP в структуре ОПС идентифицирован сигнальный пептид протяженностью 30 а.к.о. Определение N-концевой аминокислотной последовательности гомогенного белка [Рудакова и др., 2010] MprBi позволило идентифицировать

пропептидную область протяженностью из 66 а.к.о. и последовательность зрелого белка, которая включает 174 а.к.о.

1 ACTATCAGTATCGCTATTCGCTGACGACAAATGGGAAAGAGCTTTCCTCGATCAGTGTGAAG  
61 TGGACATGCCTGACCTCAAAGTACTGACGCAGCAGATGAACGAGTCGCTCTCGTTTCC  
121 TAGAGCTCGTCTCCACAATTTTATACTTTGATGACCTGCCAGAAGATGAGGTAAAGGAAA  
181 AGGTCTTCACTATTA AAAAGCAAGCAGCGCTATACGGACGAAGAATTTGAGGATGCTCTTG  
241 CTTATATTGAACAATTGAAGGAATTGAACTAGTTTCGCAAAAGCCCAGCATTTAGGGCTT  
301 TTTTGTGTTTTGTAAAGACCCAGACCAAAGCGCTATTTTCCGATGAAATGTGTGCTGAAA  
361 TATCCGAAAAATTAGTGAATATGACGTATTTTCGACTTTTTTTTTTGTGTATCCAATTCCT  
421 GTTTTTGACTGAA**TAGAAG**GAAAATGGTGAATTTTCAGT**GAATATATA**ACCTTG**TG**AAAA  
-35 -10 +1  
481 TC**AAAGGAGG**GATAGGA**ATG**AAAAAGCGTTCAGTCTTTTTGTCAATTTTATTGGTAGGT  
RBS M K K R S V F L S F L L V G  
540 AGTTTGTTACCGGGAGTAAGTTCAGCTTCAGCACCAGTCGCGAGTGCTGGTCATGGGCAT  
S L L P G V S S A S A P V A S A G H G H  
601 GATCATGGTCATGCGCCGTTTCGAAACACATATTAGTGAGGGGTTGCCAAAGGCAAACGAT  
D H G H A P F E T H I S E G L P K A N D  
661 TTTAAAGATTTGACGAAAGCACCTCCAATTGAACGAGATGTGAAAACAAAGGTATTAGAT  
F K D L T K A P P I E R D V K T K V L D  
721 GAGTCTGGTAAGCAAGTAGGCTCTAGAACCTTTAAGGCGAATACAGGAGATTCATTTC  
E S G K Q V G S R T F K A N T G D S I S  
781 ACAAAGGCAAGCACAGGCAGTCAAAAAGTAACGGTTTATGCTGTAGCAGATGCGCAGTAT  
T K A S T G S Q K V T V Y A V A D A Q Y  
841 CGTGCGAAATATAGTGACTGGCAGACGCGGATTGTCAGCATCATTGAGCAAGCGGACGTG  
R A K Y S D W Q T R I V S I I E Q A D V  
901 ACCTTTAACCGTGATCATGATGTGGACTTTGTCTGTACAAGCCGTAGGATCTTGGACGTCT  
T F N R D H D V D F V V Q A V G S W T S  
961 TCAGGATCAAATGCAGAGCAAATTTTATCTAACCTTTTCGCGCAGCTTTGATGGCAGAGGA  
S G S N A E Q I L S N L S R S F D G R G  
1021 TACGATTTTGTCACTGGATTTACAGCAAATCCAACTTTGATGCGGGCGGAATCGCTTAT  
Y D F V T G F T A N P N F D A G G I A Y  
1081 GTATACAATAGTGCACCGAGCGGAAGTGCATTCGCCGTTAACCTTGATCAAGGAACAGCG  
V Y N S A P S G S A F A V N L D Q G T A  
1141 AACACCGCAAAAGCGGCTACGCATGAATACGGTCATAACTTTGGCTTACCGCATGACCTT  
N T A K A A T H E Y G H N F G L P H D P  
1201 CAAGGCAGCGGCATTGTCTGCTTAATGAACTATGATTATTCCTACACAGTCGATTCTTT  
Q G S G I V C L M N Y D Y S Y T V D F F  
1261 GATGCGGCTCATAAAAATCAAGTGAACCGTAACAAAGCGTGGTACAGAT**TAA**AATAAGAGA  
D A A H K A N Q V N R N K A W Y R \*  
1321 CAAAAGGACAAACACCTATGTGCTTGTCTTTTTTATGCTTACAGGTCGCTGATGCGTTT  
1381 TCCTGCTACGGCATAGTGTTCTTTTTTCAATTATTCAATAATGACAGAGACTTTTTTCTGC  
1441 ACCTGCGCCTGTTGTTTCAACAACAGCATCAGTGACTTTTCTCCACAAGAGCTCTTTTTCTG

Рис. 4. Нуклеотидная последовательность гена *mprBi*. -10, -35 боксы обозначены курсивом, последовательность Шайна-Дальгарно (RBS) выделена и подчеркнута. Звездочкой отмечен стоп кодон. Предположительные терминаторы транскрипции подчеркнуты. Стрелкой указан предполагаемый сайт отщепления сигнального пептида. Мотив активного центра и метиониновый изгиб отмечены серым цветом. Терминаторы подчеркнуты.

Анализ первичной структуры белка, кодируемого геном *mprBi*, позволил выявить две маркерные последовательности HEYGHNFGLPN и CLMNY, которые соответствуют канонической структуре активного центра HEXXHXXGXXH и Met-поворота с остатком метионина, характерным для представителей клана метцинкинов. Наличие консервативных

последовательностей позволило определить семейство протеаз, к которому принадлежит продукт идентифицированного нами гена. Из таблицы 1 видно, что после третьего гистидинового лиганда в активном центре адамализиновых протеиназ, как и в случае протеиназы MprBi, расположен остаток аспарагиновой кислоты (D) [Jiang W. et al., 1992; Bode W. et al., 1992, 1993]. В таблице выделены консервативные аминокислоты активного центра и метионин в структуре Met-поворота. Кроме того, присутствие высококонсервативного цистеина (C) в структуре метионинового поворота характерно только для представителей семейства адамализинов/репролизинов (M12).

Таблица 1.

Гомология консервативных мотивов металлопротеиназ клана метцинкинов

№	Представители металлопротеиназ	Последовательность активного центра	Гомология активного центра	Последовательность Met-поворота	Гомология Met-поворота, %
1	<i>mprBi</i> – внеклеточная металлопротеиназа <i>B.intermedius</i>	<b>HEYGHNFGLPHD</b>	100	CLMNY	100
2	Zn-зависимая металлопротеиназа <i>B.pumilus</i> ATCC 7061	<b>HEYGHNFGLPHD</b>	100	CLMNY	100
3	Адамализин II <i>C.adamanteus</i>	<b>HELGHNLGMEHD</b>	66	CIMRP	40
4	Адамализин ADAM21 <i>M.mulatta</i>	<b>HELGHILGMQHD</b>	58	CIMNT	60
5	Термолизин <i>B.thearmoproteolyticus</i>	<b>HELTH</b>	25	--	--

Таким образом, изолированный нами ген *mprBi* кодирует белок, являющийся аналогом эукариотических адамализинов/репролизинов. Такие белки известны и описаны только для эукариотических организмов. Продукт идентифицированного нами гена является первым бактериальным гомологом эукариотических адамализинов.

Эукариотические секретируемые адамализины (ADAMTs) – это мультидоменные белки, в структуру которых входят продомен, протеазный домен, фурин-распознающий мотив (RxxR), дизентегриновый домен, тромбоспондин-подобный и цистеин-богатый домены. Физиологические функции адамализинов варьируют в зависимости от числа и набора доменов [Brockner et al., 2009]. Анализ конвертированной аминокислотной последовательности гена *mprBi* показал присутствие двух доменов, характерных для представителей семейства адамализинов – продомена и металлопротеазного домена (рис. 5). Отсутствие дизентегринового,

тромбоспондин-подобного и цистеин-богатого доменов в структуре MprBi может объясняться меньшим спектром действия адамализиноподобной металлопротеиназы *B.intermedius* в отличие от секретируемых адамализинов эукариот. Показано, что С-конец эукариотических адамализинов, состоящий из тромбоспондиноподобных доменов, разделенных междоменным пространством, и цистеинбогатого домена отвечает за подавление образования и разрастания опухолевых клеток [Kuno et al., 2004]. Очевидно, что в ходе эволюции прокариотических гомологов адамализинов, эукариотические белки приобрели дополнительные функциональные домены.

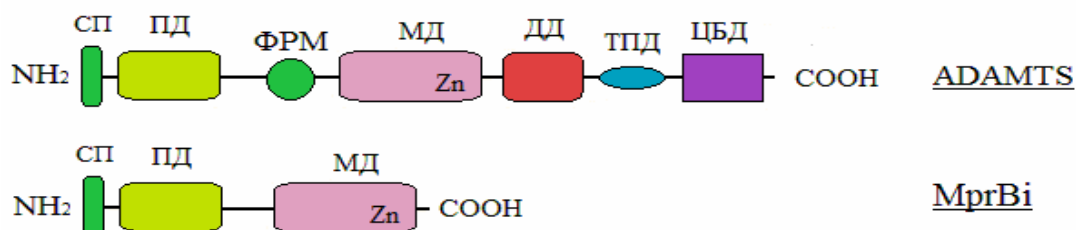


Рис. 5. Схема расположения доменов в структуре ADAMTs-белков

СП – сигнальный пептид, ПД- продомен, ФРМ – фурин-распознающий мотив, МД – металлопротеазный домен, ДД – дизентегриновый домен, ЦБД – цистеин-богатый домен, ТПД – тромбоспондин-подобный домен.

Отметим, что большинство цинковых металлоэндопептидаз бацилл имеют характерную последовательность HEXXH, представляющую активный сайт молекулы термолизина, и второй консервативный домен NEXXSD, остаток глутаминовой кислоты которого располагается в 20 аминокислотах от второго гистидинового остатка активного центра [Matthews, 1988]. В структуре протеиназы MprBi такой домен не обнаружен. Анализ последовательности генов *mprBi* и термолизиноподобной протеиназы не выявил гомологии (табл. 1).

Таким образом, в нашей работе впервые изолирован прокариотический ген, кодирующий адамализиноподобную металлоэндопептидазу MprBi клана метцинкинов, проведен его сравнительный анализ. Среди эукариотических адамализинов различают секретируемые и несекретируемые металлопротеиназы. Ранее, адамализины выделены только из змеиного яда, а также из репродуктивных тканей млекопитающих. Присутствие гена фермента этого семейства в геноме прокариот, в частности в геноме *B.intermedius*, представляет собой научную новизну и изучение его функциональной роли в клетках Monera (уровень прокариот) является приоритетным.

**Анализ регуляторной области гена *mprBi*.** Проводили выравнивание области промотора размером 400 нуклеотидов относительно канонических последовательностей для взаимодействия с регуляторными белками: фактором транскрипции Spo0A, участвующим в инициации спорообразования; фактором транскрипции DegU, контролирующим

экспрессию белков биодegradации; фактором транскрипции CspA, участвующим в катаболитной репрессии и фактором транскрипции TnrA, участвующим в контроле азотного обмена, поскольку продукты расщепления протеаз – аминокислоты, могут служить бактериям в качестве источника азота. Выявленные в результате гено-информационного анализа сайты регуляции в промоторе гена *mprBi* и степень их гомологии к консенсусам представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Потенциальные сайты взаимодействия с регуляторными белками  
в промоторе гена *mprBi*

Регуляторный белок	Консервативная последовательность	Количество сайтов	Гомология, %
Spo0A	TGTCGAA	4	71-86
TnrA	TGTNAN <sub>7</sub> TNACA	6	72-79
DegU	GTCATTAN <sub>7</sub> TAAATATC	0	-
DegU~P	GTCATTA	4	60-65
CspA	TGTAAGCGTTAACA	2	75-87
AbrB	TGGNA(A/T <sub>4</sub> )TGGNA	0	-
PhoB	CTGTCATANANCTGTCAN	0	-

Выравнивание по сайтам регуляции определило направление дальнейших исследований – изучение экспрессии гена в регуляторных мутантах.

**Влияние углеродной катаболитной репрессии на экспрессию гена *mprBi*.** В последовательности гена *mprBi* нами идентифицированы два потенциальных сайта для связывания с белком CspA, располагающиеся в регуляторной и кодирующей областях гена металлопротеиназы *B.intermedius*. Установлено, что в присутствии в среде 10 мМ глюкозы уровень протеолитической активности рекомбинантного штамма, несущего ген металлопротеиназы *B.intermedius*, резко снижается. Эти данные свидетельствовали о том, что металлопротеиназа MprBi может участвовать в утилизации альтернативных источников углерода, так как ее синтез подавляется в присутствии глюкозы. Полученные данные позволяют заключить, что экспрессия гена *mprBi* контролируется по типу углеродной катаболитной репрессии.

**Влияние DegU–фактора транскрипции на экспрессию гена *mprBi*.** В регуляторной области гена металлопротеиназы идентифицировали четыре потенциальных участка связывания с фосфорилированной формой белка DegU, что позволило предположить участие регуляторной пары DegS-DegU в контроле экспрессии гена *mprBi*. Изучение экспрессии *mprBi* в штамме,



дефектном по генам регуляторных белков DegS и DegU показало, что их нарушение приводило к снижению продуктивности рекомбинантного штамма в отношении синтеза металлопротеиназы в среднем на 60% по сравнению со штаммом с полноценной системой DegS-DegU (рис. 6). Тем не менее, отсутствие регуляторной пары не приводило к полному подавлению экспрессии гена *mprBi*, как ранее показано для гена субтилизина *B.subtilis* [Kunst et al., 1995]. Таким образом, Deg-система участвует в контроле синтеза протеиназы, но не является единственной в регуляции экспрессии гена *mprBi*. По-видимому, в отсутствии полноценной DegS-DegU регуляторной пары другие системы регуляции участвуют в активации гена *mprBi*.

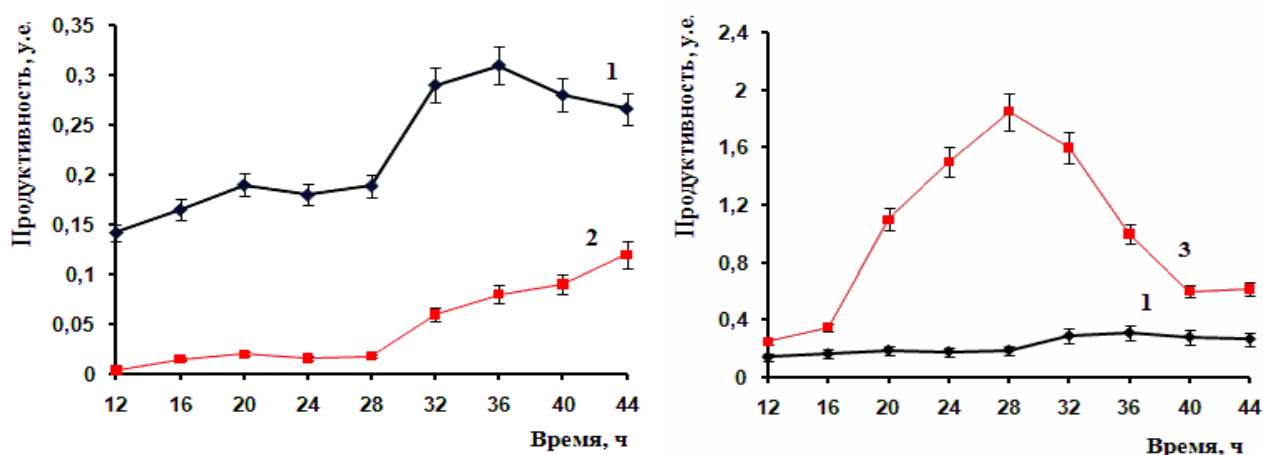


Рис. 6. Экспрессия гена металлопротеиназы.

1 - контрольный штамм *B.subtilis* 8g5; 2 - штамм *B.subtilis* 8g5, дефектный по регуляторным белкам DegS – DegU, 3 - штамм *B.subtilis* 8g5 DegU Ну.

Экспрессию *mprBi* изучали в мутантах *degU32*(Ну), у которых мутация в гене *degU* приводит к стабилизации DegU~P белка [Mäder et al., 2002]. Известно, что эта мутация приводит к многократному повышению уровня экспрессии генов, позитивно регулируемых системой DegS-DegU. Полученные нами данные показали 10-кратное увеличение продуктивности в отношении металлопротеиназы в рекомбинантном штамме *B. subtilis* 8G5 *degU32* (Ну) pSA1 (рис. 5) и позволили заключить, что фосфорилированная форма белка DegU активирует экспрессию гена *mprBi*. Таким образом, регуляторная пара DegS-DegU позитивно регулирует экспрессию гена металлопротеиназы, которая участвует в адаптационных процессах клетки, протекающих в переходный период к стационарной фазе роста, когда активируются многие системы сигнальной трансдукции [Msadek et al., 2002].

**Влияние азотной катаболитной репрессии на экспрессию гена *mprBi*.** При анализе промотора гена металлопротеиназы *B.intermedius* нами идентифицированы сайты с гомологией к консенсусной последовательности для взаимодействия с фактором транскрипции TnrA, контролирующим азотный обмен в условиях, лимитированных по азоту. Этот факт позволил

предположить, что экспрессия гена *mprBi* регулируется с участием азотной катаболитной репрессии.

Предпочтительным источником азота для клеток является аммоний. Его присутствие в среде подавляет экспрессию генов, кодирующих ферменты ассимиляции сложнометаболизируемых источников азота, например, нитрата [Detsch, Stulke, 2003]. По нашим данным, накопление протеолитической активности в культуральной жидкости рекомбинантного штамма на среде с нитратом натрия (условия голодания по источнику азота) превышало уровень активности рекомбинантного штамма *B. subtilis* pSA1 на среде с добавлением хлорида аммония в среднем на 30%. Таким образом, отсутствие легкометаболизируемого источника азота в среде стимулировало синтез фермента в окружающую среду. Эти результаты свидетельствовали о том, что биосинтез металлопротеиназы взаимосвязан с азотным метаболизмом бактерий.

Изучение экспрессии гена *mprBi* в штаммах с мутациями по генам белков транспорта аммония *AmtB* и *GlnK*, показало, что уровень протеолитической активности на среде с нитратом натрия в 3 и в 2 раза ниже уровня активности на среде с добавлением хлорида аммония соответственно (рис. 7). По результатам экспериментов, в ответ на недоступность легкоутилизируемых источников азота в клетках бактерий активируется экспрессия гена металлопротеиназы, которая регуляторно взаимосвязана с экспрессией генов *amtB* и *glnK*, продукты которых формируют аппарат транспорта ионов аммония через цитоплазматическую мембрану.

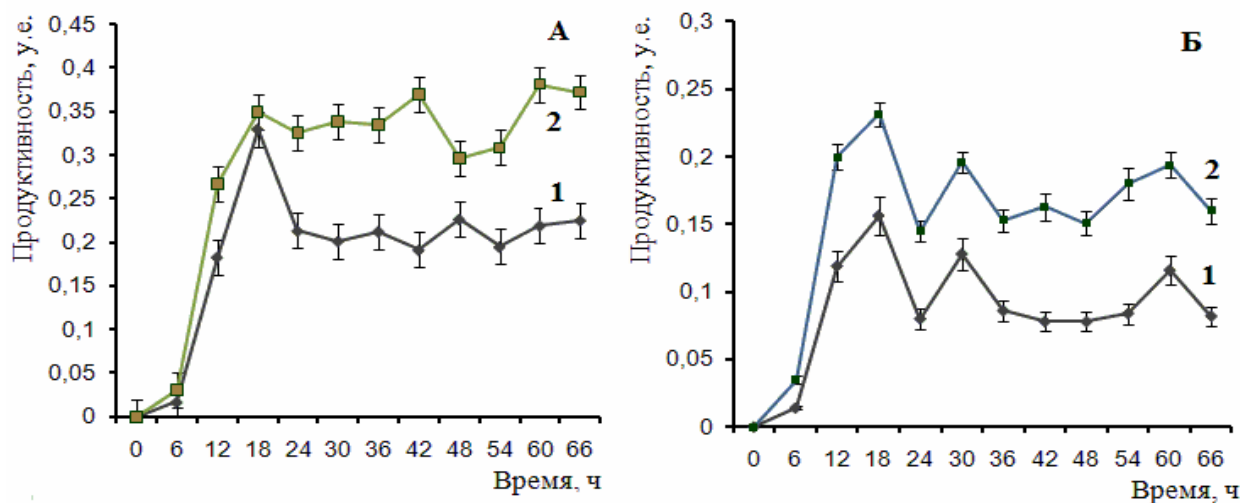


Рис. 7. Экспрессия гена *mprBi*.

А – в рекомбинантном штамме *B. subtilis*, дефектном по белку *AmtB*, Б - в рекомбинантном штамме *B. subtilis*, дефектном по белку *GlnK*,; 1 – среда, содержащая 20 мМ нитрата натрия, 2 – среда, содержащая 20 мМ хлорида аммония.

Полученные данные позволяют предположить, что в контроле транскрипции гена металлопротеиназы *B. intermedius* может участвовать

фактор транскрипции TnrA, действующий в комплексе с белком GlnK [Каюмов и др., 2010]. Независимость экспрессии гена *mprBi* от присутствия в среде предпочтительного источника азота ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) в рекомбинантном штамме с мутацией по гену *tnrA* свидетельствует о том, что азотный регулятор активен в условиях голодания по источнику азота (рис. 8,а). Однако, отсутствие полноценного белка TnrA в рекомбинантных клетках в условиях азотного голодания на синтетической среде с добавлением нитрата натрия оказывало влияние на экспрессию гена (рис. 8,б).

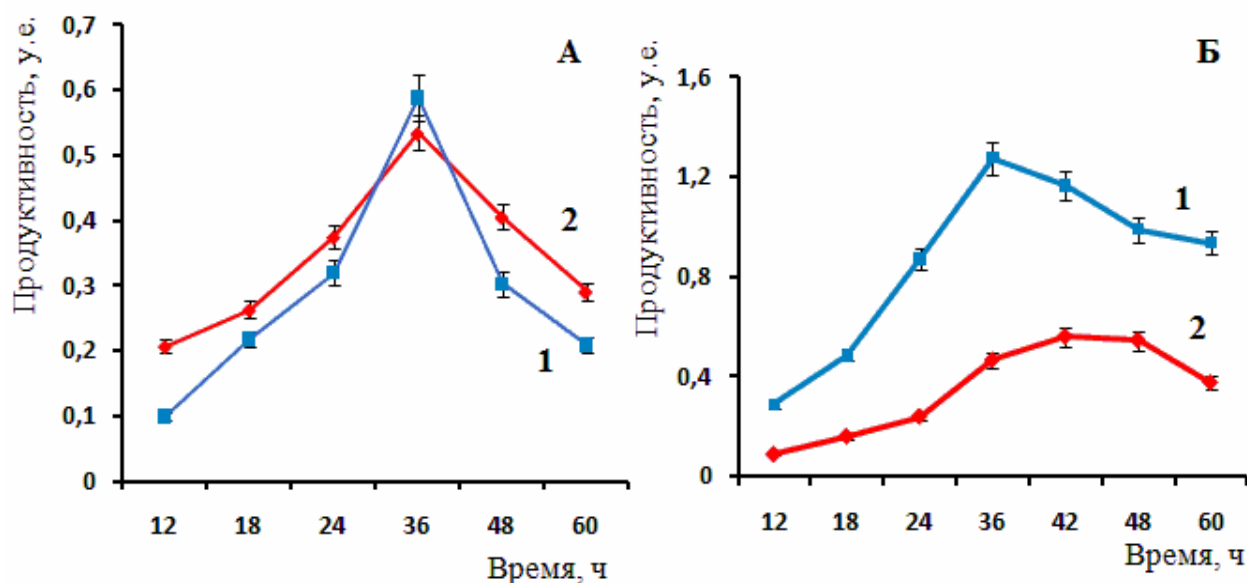


Рис. 8. Экспрессия гена *mprBi*.

А – на среде с 20 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Б – на среде с 20 мМ  $\text{NaNO}_3$  в качестве единственного источника азота; 1 - *B. subtilis* pSA1 (контроль) , 2 - *B. subtilis*  $\Delta\text{tnrA-LCC}$  pSA1.

Установлено, что уровень протеолитической активности рекомбинантного штамма *B. subtilis*  $\Delta\text{tnrA-LCC}$  pSA1 в условиях лимитации по азоту был на 40% ниже контрольного штамма с полноценным белком TnrA. Эти результаты указывают на то, что белок TnrA является позитивным регулятором экспрессии гена металлоэндопептидазы. Известно, что позитивная регуляция фактором транскрипции TnrA наблюдается в отношении генов, направленных на утилизацию различных источников азота [Fisher and Wray, 2009]. Вероятно, синтез металлопротеиназы является частью адаптационного процесса клеток, когда бактерии сталкиваются со стрессовым фактором, таким, как азотное голодание.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что реакция клеток на недостаточность легкоутилизируемых источников азота обусловлена действием системы транспорта аммония AmtB-GlnK, сопряженной с активацией фактора транскрипции TnrA.

**Влияние Spo- регуляторных белков на экспрессию гена *mprBi*.** В период перехода бацилл к дифференцировке клетки продолжают секретировать гидролитические ферменты, в том числе и протеиназы. В сети сигнальной трансдукции при переходе к споруляции ключевая роль принадлежит регуляторному белку Spo0A [Piggot and Hilbert, 2004]. В промоторе гена металлопротеиназы выше открытой рамки считывания нами идентифицированы участки ДНК с высокой гомологией к последовательности Spo0A-бокса - TGNCGAA. Тандемы Spo0A-боксов характерны для генов Spo0A-регулона [Fujita et al., 2005]. В связи с чем мы предположили, что синтез металлопротеиназы может быть связан со споруляцией и контролируется регуляторным белком Spo0A.

Установлено, что в рекомбинантном штамме, дефектном по регуляторному белку Spo0A, уровень экспрессии гена *mprBi* сохранялся на уровне экспрессии в штамме с полноценным геном *spo0A* (рис. 9). Такую же закономерность мы получили при изучении экспрессии гена *mprBi* в штаммах, дефектных по другим спороспецифичным регуляторным белкам (рис. 9). Во всех используемых в работе spo-регуляторных мутантах уровень экспрессии гена *mprBi* сохранялся на уровне контрольного штамма с соответствующими полноценными белками (рис. 9). Эти данные свидетельствуют о независимости экспрессии гена *mprBi* от Spo-регуляторных белков. На этом основании мы сделали заключение, что экспрессия гена металлопротеиназы не коррелирует со спорообразованием в отличие от экспрессии генов сериновых протеиназ *B.intermedius* [Sharipova et al., 2006; Шагимарданова и др., 2007].

В спорулирующей культуре только часть клеток популяции *B.subtilis* формирует эндоспоры, что приводит к образованию состояния бистабильности [Veening et al., 2008]. При этом культура бактерий разделяется на две субпопуляции – спорулирующие и вегетативные клетки. В первых клетках активен Spo0A фактор транскрипции (Spo0A+ клетки), во вторых клетках этот фактор находится в неактивном состоянии (Spo0A– клетки) (рис. 10). Установлено, что в вегетативной субпопуляции функционально-активным регулоном является *degU* регулон [Veening et al., 2008]. Клетки, принадлежащие к Spo0A+ субпопуляции, способны синтезировать киллер-факторы, которые приводят к лизису клеток Spo0A– субпопуляции. В результате лизиса компоненты разрушенных клеток становятся источником питания для Spo0A+ клеток, при этом процесс споруляции может пролонгироваться [Engelberg-Kulka et al., 2006].

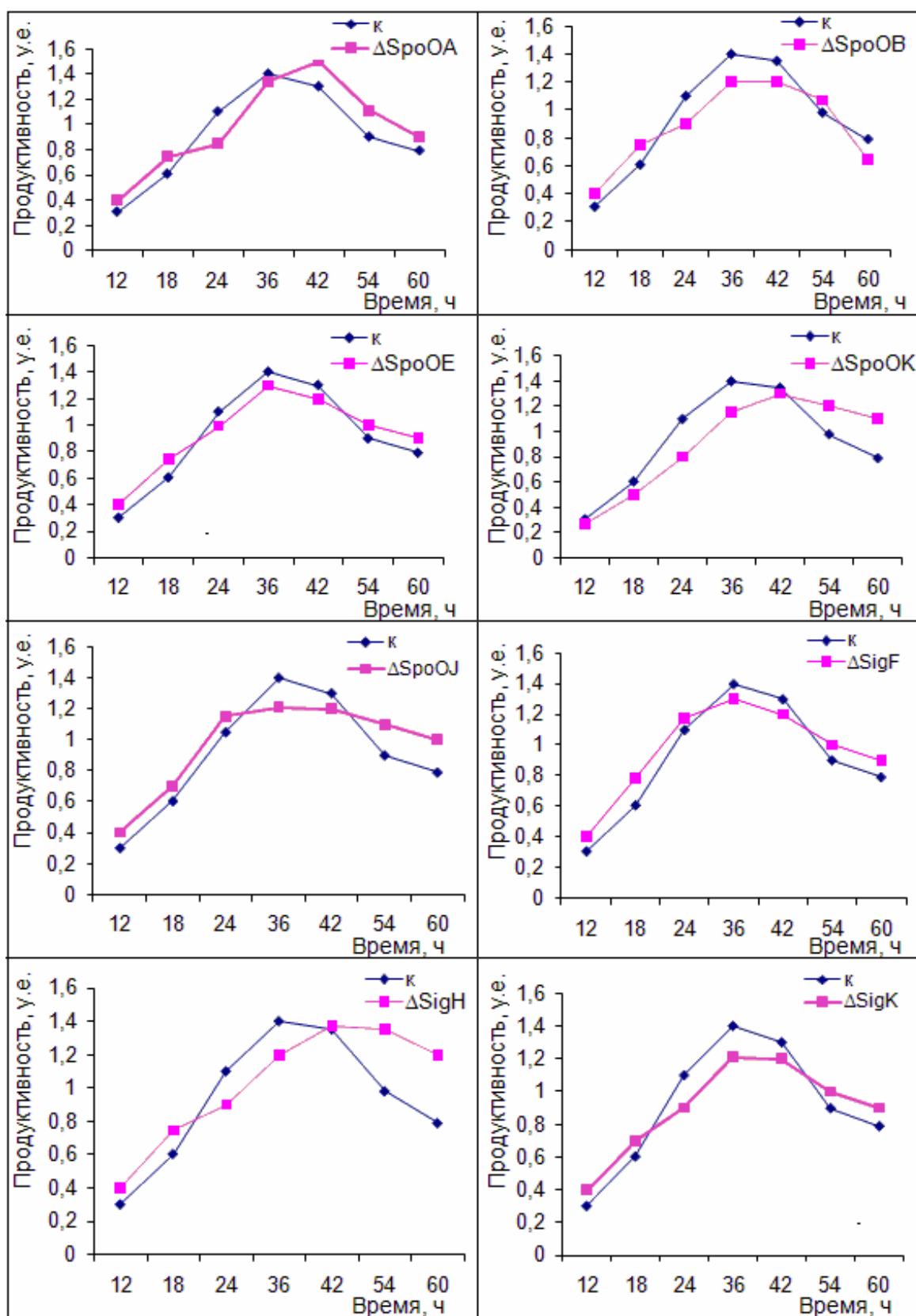


Рис. 9. Экспрессия гена металлопротеиназы в штамме *B.subtilis* (pSA1) и штаммах, дефектных по Spo-регуляторным белкам.

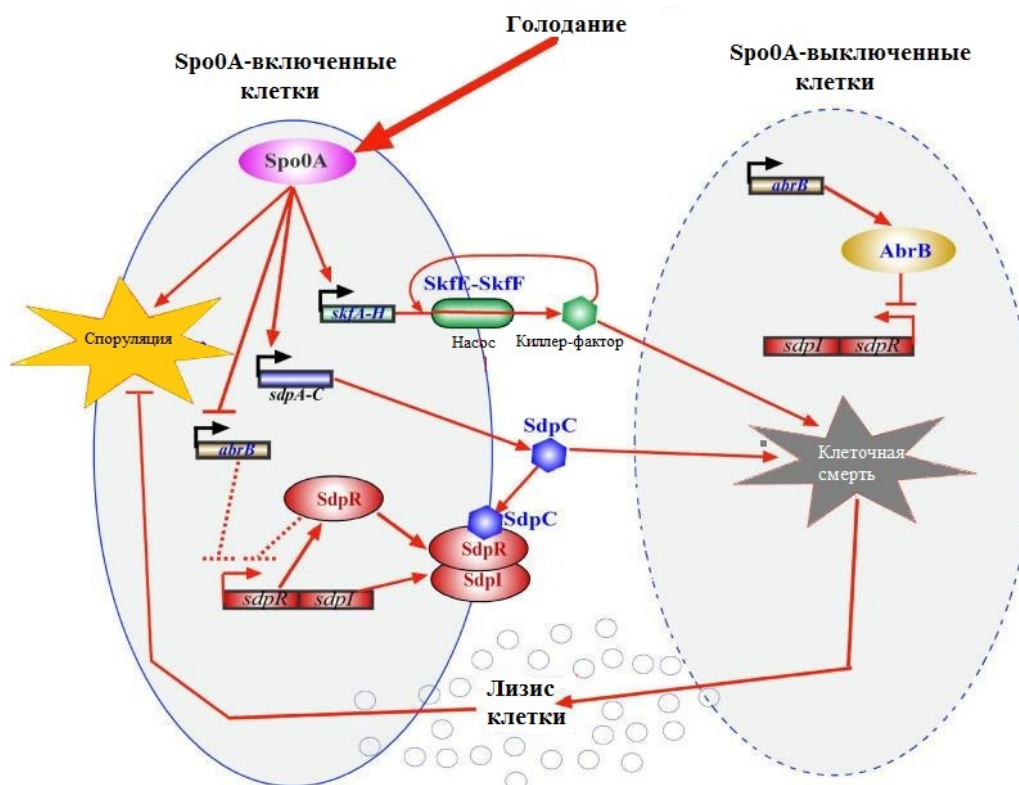


Рис. 10. Схема процесса задержки споруляции Spo0A+ субпопуляции, вызванной клеточной смертью Spo0A– субпопуляции [Engelberg-Kulka et al., 2006].

Согласно современным представлениям (рис. 10) ген *mprBi*, который позитивно регулируется постэкспоненциальными системами регуляции относится к DegU-регулону в вегетативной Spo0A– субпопуляции клеток. Контроль генов, экспрессирующихся в этих клетках, осуществляется регуляторными белками DegU, CsrA, ComA и TnrA. Таким образом, экспрессия гена *mprBi* связана с формированием интегрированного ответа клеток бацилл в переходный период, когда активируются и корегулируются многие ответы постэкспоненциальной фазы. При этом образование фермента не взаимосвязано с процессом споруляции.

Итак, в геноме *B.intermedius* впервые у бацилл выявлен и охарактеризован ген, кодирующий гомолог эукариотических металлопротеиназ – адамализинов клана метцинкинов. В структурной области гена нового бактериального фермента идентифицированы маркерные последовательности, позволяющие классифицировать соответствующий белок как представителя клана метцинкинов семейства адамализинов/репролизинов. По данным геноинформационного анализа гомологичные гены присутствуют в геномах других бацилл. Анализ регуляторной области гена новой адамализиноподобной металлопротеиназы *B.intermedius* выявил сложную организацию промотора, что свидетельствует о его множественной регуляции. Полученные данные позволяют сделать заключение, что экспрессия гена



*mprBi* модулируется различными регуляторными системами в период постэкспоненциального роста. Экспрессия гена новой бактериальной адамализиноподобной металлопротеиназы контролируется механизмами углеродной и азотной катаболитной репрессии. Установлено, что белки транспорта аммония GlnK и AmtB совместно с глобальным фактором транскрипции TnrA участвуют в контроле экспрессии гена. Двухкомпонентная система DegS-DegU, ответственная за синтез ферментов биodeградации, оказывает позитивное влияние на экспрессию гена *mprBi*. В клетках эукариот адамализины/репролизины выполняют защитную функцию, будучи агрессивными компонентами змеиных ядов. По аналогии с эукариотическими белками можно предположить, что бактериальные адамализиноподобные протеиназы в клетках прокариот могут выполнять защитную функцию. Клетки бацилл, сталкиваясь с неблагоприятными воздействиями окружающей среды и недостатком питательных веществ, начинают синтезировать металлопротеиназу как фактор агрессии. Таким образом, экспрессия гена металлопротеиназы является одним из адапционных ответов в постэкспоненциальный период роста спорообразующих бактерий.

## ВЫВОДЫ

1. Установлена последовательность нуклеотидов 6 кб фрагмента хромосомной ДНК *B.intermedius* (AN EU678894), в которой идентифицированы 6 ОРС, включая две металлопротеиназы - внеклеточная MprBi и мембраносвязанная PmbBi. Гены не имеют гомологии, соответствующие им продукты относятся к разным кланам белков: M12 и M50.
2. Впервые изолирован и охарактеризован бациллярный ген, кодирующий протеолитический фермент - гомолог эукариотических адамализинов. В структурной области гена *mprBi* выявлены функциональные домены, позволяющие отнести белок к клану метцинкинов.
3. Установлено, что DegS-DegU регуляторная система, контролирующая синтез ферментов биodeградации, играет позитивную роль в регуляции экспрессии гена *mprBi*.
4. Показано, что экспрессия гена металлопротеиназы *B.intermedius* регулируется азотной катаболитной репрессией с участием фактора транскрипции TnrA, а также белков GlnK и AmtB, обуславливающих транспорт аммония в клетку.
5. Установлено отсутствие регуляторной взаимосвязи между экспрессией гена *mprBi* и споруляцией.

**Публикации по теме диссертации в изданиях,  
рекомендованных ВАК:**

1. Sabirova A.R. A novel secreted metalloproteinase *Bacillus intermedius* – the first adamalysin-like enzyme from bacilli / A.R.Sabirova, N.L.Rudakova, N.P.Balaban, O.N.Il'inskaya, I.V.Demiduyk, S.V.Kostrov, G.N.Rudenskaya, M.R.Sharipova // FEBS letters. -2010. -V.584. - №21. – P. 4419-4425.
2. Сабирова А.Р. Структурная организация гена металлоэндопептидазы *Bacillus intermedius* / А.Р.Сабирова, М.Р.Шарипова // Учен. Зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. -2010. –Т. 152, кн. 2. -С. 155-166.
3. Рудакова Н.Л. Секретируемая металлопротеиназа *Bacillus intermedius*: получение гомогенного препарата фермента и исследование физико-химических свойств / Н.Л.Рудакова, **А.Р.Сабирова**, А.Р.Каюмов, А.М.Марданова, Н.П.Балабан, М.Р.Шарипова // Учен. Зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. -2010. – Т. 152, кн. 2. - С. 145-155.
4. Балабан Н.П. Металлоэндопептидазы клана метцинкинов: классификация, свойства, структурные особенности / Н.Н.Балабан, Н.Л.Рудакова, **А.Р.Сабирова**, О.Н.Ильинская, М.Р.Шарипова // Учен. Зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. -2010. –Т. 152, кн. 2. - С. 57-78.
5. Каюмов А.Р. Влияние системы регуляции азотного обмена на биосинтез сериновых протеиназ *Bacillus intermedius* / А. Р. Каюмов, Т.Р. Шамсутдинов, **А.Р.Сабирова**, М. Р.Шарипова // Микробиология. -2009. -Т. 78. -№6. -С. 742-748.
6. Каюмов А.Р. Стартовый кодон в гене сериновой протеиназы ArgVi из *Bacillus intermedius* / А.Р.Каюмов, **А.Р.Сабирова**, Н. П.Балабан, А.М.Марданова, С.В.Костров, О.Н.Ильинская, М.Р.Шарипова // Молекулярная биология. -2008. -Т. 42. -№1. -С. 117-122.

**Другие публикации по теме диссертации:**

7. Байрамов Р.А. Роль двухкомпонентной системы трансдукции сигнала DegS-DegU в регуляции синтеза протеиназ *Bacillus intermedius*/ Байрамов Р.А., **Сабирова А.Р.**, Каюмов А.Р, Шарипова М.Р. // Материалы XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». -Казань, 4-8 апреля, 2005. - С. 14.
8. Сабирова А.Р. Экспрессия гена металлопротеиназы *Bacillus intermedius* в условиях лимитации азота в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* / А.Р. Сабирова, А.Р. Каюмов, М.Р. Шарипова // Материалы XIV Международной конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов -2007». –М., 2007. – С. 26-27.



9. Рудакова Н.Л. Гетерологичная экспрессия гена нейтральной протеиназы *Bacillus intermedius* в клетках *Bacillus subtilis* / Н.Л. Рудакова, **А.Р. Сабирова**, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы XIV Международной конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2007». – М., 2007. – С. 86.
10. Сабирова А.Р. Гетерологичная экспрессия гена металлопротеиназы *Bacillus intermedius* в условиях лимитации азота / А.Р. Сабирова, А.Р. Каюмов, М.Р. Шарипова // Материалы VI Международного симпозиума «Химия протеолитических ферментов». – М., 2007. – С. 65.
11. Сабирова А.Р. Секвенирование и анализ 6 кб фрагмента геномной ДНК *Bacillus intermedius*, содержащего ген протеазы / А.Р. Сабирова, Н.Л. Рудакова, А.Р. Каюмов, М.Р. Шарипова // Материалы XV Международной конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2008». – М., 2008. – С. 47.
12. Шарипова М.Р. Вклад сигнальной трансдукции в регуляцию клеточного ответа в стационарную фазу роста бацилл / М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, А.М. Марданова, А.Р. Каюмов, Т.Р. Шамсутдинов, Е.О. Михайлова, **А.Р. Сабирова**, А.А. Тойменцева, Н.Л. Рудакова // Материалы IV Съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – М., 2008. – С. 116.
13. Sabirova A.R. Gene coding for metalloprotease of *Bacillus intermedius* / M.R. Sharipova, N.P. Balaban, A.M. Mardanova, A.R. Kayumov, A.R. Sabirova, N.L. Rudakova, E.I. Shagimardanova and Gusev, O.A. // GeneBank NCBI – EU678894. -2008.
14. Пономарева Ю.О. Построение контига геномной ДНК *Bacillus intermedius* / Ю.О. Пономарева, А.Д. Мухаметзянова, **А.Р. Сабирова** // Материалы XLVI международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». – Новосибирск, 2008. – С. 42.
15. Шарипова М.Р. Особенности регуляции функциональной активности экспрессии генов протеиназ в условиях стресса у бацилл / Шарипова М.Р., Тойменцева А.А., Каюмов А.Р., **Сабирова А.Р.**, Рудакова Н.Л., Балабан Н.П. // Материалы докладов IV Российского симпозиума «Белки и пептиды». – Казань, 2009. – С. 96.
16. Рудакова Н.Л. Новая металлопротеиназа *Bacillus intermedius* / Рудакова Н.Л., **Сабирова А.Р.**, Данилова Ю.В., Балабан Н.П., Шарипова М.Р. // Материалы докладов IV Российского симпозиума «Белки и пептиды». – Издательство «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН. – Казань, 2009. – С. 298.

17. Sabirova A.R. A novel metalloprotease of *Bacillus intermedius* / A.R.Sabirova, M.R.Sharipova // 14<sup>th</sup> International conference «Microbial enzymes in biotechnology and medicine». –Kazan, 2009. - P. 50-51.
18. Саби́рова А.Р. Влияние факторов транскрипции на экспрессию гена металлопротеиназы *Bacillus intermedius*/ А.Р.Саби́рова, Шагимарданова Е.И., Хабибуллина Н.М., Сибгатуллина Э.Э., М.Р.Шарипова// Материалы докладов Российской школы молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». –Минск, 2010. –С. 52.
19. Черемин А.М. ДНК-белковое взаимодействие промотора гена металлопротеиназы *Bacillus intermedius* с факторами транскрипции/ А.М.Черемин, **А.Р.Саби́рова**, А.А.Тойменцева, М.Р.Шарипова // Материалы докладов Российской школы молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». –Минск, 2010. –С. 67.
20. Саби́рова А.Р. Металлопротеиназа *Bacillus intermedius* / А.Р.Саби́рова, Н.Л.Рудакова, Ю.В.Данилова, Н.П.Балабан, М.Р.Шарипова// Труды Томского Университета. Сер.Биологическая. -Т. 275.-Томск, 2010. –С. 396-398.

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне.